UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1950-1951 — N° 135

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES COLLAGENASES MICROBIENNES

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 27 Juillet 1951

PAR

Jacques Pierre Arnaud MILHADE

Élève du Service de Santé de la Marine
Diplômé de Médecine Tropicale

Né le 21 Mai 1927 à LIBOURNE (Gironde)

Examinateurs de la Thèse

DE GRAILLY, Professeur	*Président*
PIÉCHAUD, Professeur.....	*Juges*
VERGER Agrégé	
TRAISSAC Agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE RENÉ SAMIE
21-23, rue Teulère

1951

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1950-1951 — N° 135

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES COLLAGENASES MICROBIENNES

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 27 Juillet 1951

PAR

Jacques Pierre Arnaud MILHADE

Élève du Service de Santé de la Marine
Diplômé de Médecine Tropicale

Né le 21 Mai 1927 à LIBOURNE (Gironde)

Examinateurs de la Thèse

DE GRAILLY, Professeur	*Président.*
PIÉCHAUD, Professeur.....	*Juges.*
VERGER Agrégé	
TRAISSAC Agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE RENÉ SAMIE
21-23, rue Teulère

1951

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN HONORAIRE : M. DUPÉRIÉ.
DOYEN : M. PORTMANN. — **ASSESSEUR** : M. CHELLE.

PROFESSEURS HONORAIRES :
MM. A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, MACHEBŒUF

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	DUPÉRIÉ.
id.	CREYX.
Clinique chirurgicale	PAPIN.
id.	MASSÉ.
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE.
Clinique gynécologique	MAGENDIE.
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY.
Anatomie	VILLEMIN.
Anatomie générale et histologie	MAYER.
Hygiène et clinique de la tuberculose.	PIÉCHAUD.
Médecine légale et Médecine du travail	DERVILLÉE.
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL.
Chimie	CHELLE.
Matière médicale	GOLSE.
Pharmacie	VITTE.
Physiologie	FABRE.
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN.
Zoologie et parasitologie	SIGALAS.

	MM.
Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOUBAT.
Clinique des maladies infectieuses	N.....
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT.
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA.
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET.
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU.
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD.
Thérapeutique	BROUSTET

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL : M. MESNARD (Pharmacie)

PROFESSEURS SANS CHAIRE :
MM. PERRENS (Maladies mentales), DUFOUR (Anatomie), BLANQUET (Physique pharmaceutique).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Parasitologie	PAUTRIZEL.
Physiologie	Mlle ROUGIER.
actériologie	MOUSTARDIER.

	MM.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE.
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	SARIC.
id.	DUBARRY.
id.	F.-J. TRAISSAC.
id.	BERGOUIGNAN.
id.	LENG-LÉVY.
Chirurgie générale	POUYANNE.
id.	LAUMONIER.
id.	CHAVANNAZ.
Obstétrique	MAHON.
id.	CHASTRUSSE.

	MM.
Ophtalmologie	BESSIÈRE.
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT.
Histologie	N.....
Pédiatrie et puériculture	VERGER.
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE.
Electro-radiologie	LACHAPÈLE.
Odonto-stomatologie	MARONNEAUD
Urologie	LANGE.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	DUFOUR.
Accouchements	VERGER.
Puériculture	PERY
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.
id.	COUSTOU.
Anatomie	RIGAUD.
Chimie générale et analytique	BABIN.
Cryptogamie	LAUBIE.

	MM.
Pharmacie galénique	MESNARD.
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE.
Chimie biologique	NEUZIL.
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER.
id.	VILLAR.
Zoologie pharmaceutique	BAILANGER.
Hydrologie pharmaceutique	CAZAUX.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

En témoignage de reconnaissance infinie.

A MA SŒUR

A TOUS MES PARENTS ET AMIS

A MES CAMARADES
DE L'ÉCOLE DE SANTÉ NAVALE

A Monsieur le Médecin-Général GALIACY

Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé
de la Marine et des Colonies
Commandeur de la Légion d'honneur
Croix de guerre
Médaille de la Résistance

A Monsieur le Médecin en Chef SIMON

Sous-Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé
de la Marine et des Colonies
Médecin des Hôpitaux de la Marine
Officier de la Légion d'honneur
Officier d'Académie
Médaille d'Argent de l'Education Physique

A NOS PROFESSEURS
DE L'ÉCOLE DE SANTÉ NAVALE

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ
ET DES HOPITAUX DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE MÉDECIN PRINCIPAL BRISOU

Professeur Agrégé des Ecoles de Médecine Navale
Spécialiste des Hôpitaux Maritimes
Docteur ès Sciences
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui nous a inspiré cette thèse.

Témoignage de la profonde gratitude que nous devons au Maître qui pendant trois années nous a prodigué ses enseignements lumineux, et nous a constamment conseillé et aidé au cours de ce travail.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ VERGER

Médecin des Hôpitaux
Officier d'Académie

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ TRAISSAC

Médaille d'Or de l'Internat
Médecin adjoint des Hôpitaux
Officier d'Académie

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. PIÉCHAUD

Professeur d'Hygiène et de Clinique de la Tuberculose
Médecin des Hôpitaux
Officier de la Légion d'Honneur
Chevalier de l'Ordre de la Santé
Croix de guerre
Officier de l'Instruction Publique
Fellow in the American College of Chest Physicians

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur R. de GRAILLY

Professeur d'Anatomie Pathologique
et Microscopie Clinique
Médecin des Hôpitaux
Membre correspondant de la Société Médicale
des Hôpitaux de Paris
Médecin de la Fondation Bergonié
Officier de l'Instruction Publique
Croix des Services Militaires Volontaires

Qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

En témoignage de respectueuse gratitude pour la bienveillance avec laquelle il nous admit dans son Laboratoire d'Anatomie-Pathologique à la Faculté.

INTRODUCTION

La Microbiologie et la Chimie ne sont jamais restées étrangères l'une à l'autre depuis le jour où la Microbiologie est née du génie de PASTEUR, chimiste soucieux de connaître la cause des fermentations. Nous les voyons aujourd'hui se rencontrer et se fondre au point où le vivant confine à l'inerte, où les macromolécules enzymatiques ne se distinguent plus des macromolécules virales. Virus et enzymes d'ailleurs, diffèrent peu dans leur mode d'action, et si nous remontons l'échelle des êtres vivants, les bactéries encore ne sont que des producteurs d'enzymes, plus différenciés, plus puissants.

L'arsenal enzymatique des bactéries dépasse en richesse l'imagination. Il n'est pas une substance sur la terre qui ne soit accessible à l'action d'un ferment. C'est du reste grâce aux enzymes, à leur infinie variété, que la vie peut persister, que s'accomplissent les grands cycles de la nature : cycle de l'azote, cycle du carbone, cycle du soufre, oxydations et réductions ne dérouleraient pas leurs chaînes sans l'existence des processus fermentatifs. Les bactéries président à la minéralisation de l'organique et réciproquement organisent le minéral.

Biologistes et anatomo-pathologistes devaient se pencher sur les problèmes du pouvoir pathogène de ces infiniments petits. Par quels mécanismes expliquer les effets à distance de germes localisés à des lésions minimes, où leurs effets locaux terrifiants parfois comme ceux que l'on observait jadis dans la gangrène gazeuse ?

L'étude des toxines, *in vitro* et *in vivo*, a permis d'éclaircir bon nombre de faits obscurs. Pouvoirs léthaux, nécrosants, hémolytiques, propriétés de désintégration des graisses, des protéines et tant d'autres effets aussi puissants que variés, ont été mis en évidence. Des enzymes en sont responsables : sucrases, lipases, protéinases, agissant de la même manière que la papaïne, protéinase banale mais dont les propriétés nous intéresseront par leurs ressemblances nombreuses avec celles des protéinases bactériennes qui constituent le sujet de ce travail : les *Collagénases*.

Les Collagénases, qui, par définition, exercent une action élective sur le Collagène, ont été, comme nous le verrons, très étudiées par les microbiologistes, mais il plane sur l'ensemble de ces travaux une équivoque qu'il convient de dissiper.

Beaucoup d'auteurs, en effet, ont omis avant d'étudier les Collagénases, de considérer dans le détail la composition et la constitution du réactif permettant de les déceler et de leur attribuer à bon escient le titre de Collagénase : à savoir, le Collagène.

Cette lacune semble avoir eu pour conséquence l'abus du terme de Collagénase.

Notre plan sera donc le suivant :

1° Etude complète du Collagène. Son mode de préparation ;

2° Détection des Collagénases chez les clostridiacées de la gangrène gazeuse ;

3° Discussion des résultats et Conclusions.

CHAPITRE PREMIER

LE COLLAGÈNE

SA PLACE DANS LE TISSU CONJONCTIF.

Le Collagène est pour les histologistes, la substance fondamentale du tissu conjonctif ; présent dans tous les territoires de l'organisme, il est la véritable charpente du squelette osseux, des téguments et de tous les organes. Il se densifie parfois pour former les tendons, le cartilage, le derme, il constitue ailleurs une trame plus discrète au niveau des ganglions et de la rate, par exemple.

Mais c'est au sein du tissu conjonctif qu'il nous faut le considérer, car il en est issu, et sa genèse est encore mystérieuse, mais surtout il tient des autres constituants du conjonctif la cohésion de ses faisceaux, de ses fibres mêmes, et ne peut à lui seul former les « barrières » tissulaires, son rôle est uniquement de les soutendre.

La substance fondamentale intercellulaire comprend deux sortes d'éléments, les uns sont fibrillaires : Collagène, réticuline et élastine ; les autres, les plus importants, sont amorphes : complexes de protéines et de polysaccharides et liquide interstitiel tenant en suspension des protéines solubles, des sels minéraux, tous les produits et agents des divers métabolismes.

A) *Substances amorphes.*

Avant de décrire le Collagène, nous insisterons tout spécialement sur les mucopolysaccharides qui semblent être à la base de la structure du tissu fibreux. Cette longue parenthèse nous permettra, en outre, d'aborder certains aspects de la physiopathologie du tissu conjonctif.

Les mucopolysaccharides sont les substances cimentantes (Karl MEYER [57], DAY [23]) qui entourent les fibrilles collagènes et forment entre celles-ci, comme supportées par ce « grillage », des lamelles (LAGUESSE [49], DAY) ou une gangue relativement imperméable dans son état « normal » qui serait un état de haute polymérisation, de haute viscosité, et qui pourrait subir l'influence dépolymérisante (GERSH et CATCHPOLE [31]) de certains enzymes endogènes (fibroblastes, cellules néoplasiques) ou exogènes : complexes enzymatiques des toxines microbiennes et hyaluronidases en général. Ce sont, en effet, des substances analogues à l'acide hyaluronique, ou voisines : les acides chondroïtine sulfurique et mucoïtine sulfurique (PARTRIDGE [66]).

Ces variations de la substance fondamentale amorphe expliqueraient certains faits physiologiques : croissance et remaniements tissulaires, modifications de la perméabilité des capillaires (dont les parois sont entourées d'une lame de cette substance fondamentale), ramollissement et distension de la symphyse pubienne au cours de la gestation, libération de l'ovule par affaiblissement de la paroi du follicule et chute de la couche superficielle de la muqueuse utérine au cours du cycle menstruel. En pathologie, un mécanisme identique permettrait les exsudats par augmentation de la perméabilité capillaire, et l'extension des processus infectieux et néoplasiques.

Les dégénérescences hyalines, fibrinoïdes et amyloïdes ne seraient encore que des modifications profondes de l'état physico-chimique des mucopolysaccharides ou des complexes protéines-mucopolysaccharides (les protéines de ces complexes ne sont pas identifiées). D'après ALTSHULER et ANGEVINE [1] la cause de ces modifications est dans

certains cas (?) l'apparition locale de protéines basiques produits de la nécrose des celllues voisines, peut-être du Collagène lui-même, ou en circulation dans le sang et le milieu interstitiel. Une autre raison possible ressort des études récentes sur les syndromes d'hypoprotéinémie et le rôle des hormones glucido-protidiques, à savoir le déplacement des protéines tissulaires dans les états pathologiques à évolution prolongée et cachectisante ; cette disparition d'un composant essentiel de la substance fondamentale entraînant des troubles graves de son état physico-chimique. Le point commun à ces dégénérescences et aux substances qui en font les frais (mucopolysaccharides) étant la métachromasie, réaction donnée par quelques colorants et assez strictement limitée à quelques substances, parmi lesquelles les mucopolysaccharides à haut poids méloculaire sont les plus représentatifs (sinon les seuls représentés) (Lison [50], Wislocki, Bunting, Dempsey [87]).

Les maladies dites « du Collagène » sont-elles alors des affections de cette partie du tissu conjonctif qui apparaît aussi passive que l'ébauche de cire gaufrée offerte aux abeilles, qui ne sera rien de plus qu'un cadre modeste au merveilleux travail de ces insectes? Les maladies du Collagène ne seraient-elles pas plutôt une perturbation de cette substance amorphe (Gale [30]) entraînant par la suite des « lésions » de la trame collagène dont la gangue de polysaccharides est essentielle, sa disparition enlevant toute solidité à la fibrille qui se romprait alors très facilement.

La disparition du Collagène ne peut cependant pas s'expliquer d'une manière satisfaisante par ce seul mécanisme. Y a-t-il une action chimique concomitante sur l'agencement moléculaire des fibrilles, sur les liens intermoléculaires du polypeptide? Action de dépolymérisation? C'est le domaine de l'hypothèse.

L'importance histologique du Collagène dans la sclérose est certaine, son rôle dans la genèse de cette « réaction habituelle » de l'organisme l'est beaucoup moins ; fait-il partie de l'aspect initial du tissu scléreux, ou vient-il « fixer » une substance amorphe sécrétée au début par les

fibroblastes et de nature polysaccharidique ? (recherches de FIESSINGER [29], de MORRIONE [58]). L'ignorance où nous sommes de la source exacte des fibrilles collagènes ne permet pas de se prononcer. L'apparition fréquente de substances métachromatiques (mucopolysaccharides) dans les processus pathologiques (HUDACK, BLUNT, HIGBEE et KEARIN [43]), le rôle des mastzellen dans ce phénomène (URTUBEY [82], POFF et BLOOM [70]), les troubles du métabolisme de l'acide ribonucléique paraissant en rapport avec cette formation exagérée de substance fondamentale, et bien d'autres faits encore, sont par contre en faveur d'un rôle primordial de ces éléments « amorphes » dans la sclérose naissante. La lumière viendra peut-être, comme le souhaite KLEMPERER [88], des recherches plus poussées dans le domaine de la culture tissulaire et du microscope électronique (travaux de WOLBACH [88], de HASS et MAC DONALD [40], de PORTER et VANAMEE [71], de GROSS [35]).

La substance intercellulaire aussi bien dans sa genèse que dans ses troubles et sa destruction, est sous la dépendance de nombreux facteurs hormonaux, vitaminiques et enzymatiques, ces derniers produits dans les tissus mêmes par les cellules conjonctives ou épithéliales (tumeurs), sous l'incitation probable des hormones. De nombreux auteurs se sont penchés sur ce problème. La cortisone et l'A.C.T.H., depuis les travaux de SELYE, ont été reconnus très actifs sur les processus pathologiques mésenchymateux : maladies du Collagène, cicatrisation, adhérences, cirrhoses du foie, etc... (PLOTZ, HOWES, K. MEYER, LATTS et RAGAN [69], BAGGENSTOSS, SHICK et POLLEY [6], SPAIN, MOLOMUT et HABER [76], ATERMAN [5], DUCOMMUN et MACH [26]). Parallèlement, on expérimente la désoxycorticostérone (PIRANI et STEPTO [68]) qui agit àl'inverse de la cortisone : elle favorise la prolifération des fibroblastes et le processus de cicatrisation. Les effets de l'hypophyse, de la thyroïde et des hormones sexuelles sur la cicatrisation montrent que chacune des glandes endocrines joue un rôle inhibiteur (hormones sexuelles) ou stimulant (hormone de croissance, thyroxine, D.O.C.A.), sur l'activité du

tissu conjonctif, mais qu'il y a aussi une interdépendance, une synergie d'action entre tous ces facteurs (TAUBENHAUS et AMBROMIN [77]).

Parmi les vitamines, les tocophérols et l'acide ascorbique semblent indispensables au maintien de l'intégrité du tissu conjonctif (BURGESS [19], ELSTER [27]).

Enfin, parmi les enzymes, l'hyaluronidase tissulaire, semblable au facteur de diffusion de DURAN-REYNALS, a une part très active dans les remaniements tissulaires (GROSS [35], BENSLEY [9], CATCHPOLE [20]). Par sa propriété de modifier la viscosité de la substance fondamentale, elle permet les migrations cellulaires, les modifications physiologiques ou pathologiques des échanges entre la circulation et les tissus, peut-être même la formation et la pénétration des fibres collagènes. Son rôle probable dans le cancer est attesté par le pouvoir antihyaluronidasique du sérum des malades et l'augmentation parallèle des glycoprotéines circulantes.

Il nous faut envisager aussi, pour situer pleinement le Collagène dans le tissu conjonctif, deux éléments fibrillaires comme lui : l'élastine et la réticuline. La première, que certains auteurs (ASTBURY [3] en particulier) classent dans la groupe des kératines, très différentes chimiquement et par leurs propriétés physiques, n'a pas une aussi large répartition que le Collagène et l'orcéine permet toujours de la différencier de celui-ci. La réticuline, par contre, pose un problème encore mal résolu, celui de ses rapports avec le Collagène. Les anciens histologistes l'ont appelée « Précollagène » et en 1933, HERINGA [41] parlait de sa « maturation en Collagène » mais cet auteur a discuté depuis (1948) sa première opinion ; il ne semble plus admettre l'existence d'une fibre de type intermédiaire décrite dans son premier travail. Les anatomo-pathologistes (MACFARLANE et MAC LENNAN [54], ROBB-SMITH [74]) décrivant les lésions de la gangrène gazeuse, ne font pas de différences nettes entre les altérations des deux systèmes. Cependant, sa composition chimique, mal connue d'ailleurs, et ses réac-

tions tinctoriales n'ont, semble-t-il, rien de commun avec celles du Collagène.

Les rapports, enfin, de la fibrine et du Collagène (NAGEOTTE et L. GUYON [59]) ne sont plus admis ; la collagénisation d'un caillot de fibrine est une « substitution » du Collagène à la fibrine et non une « transformation » de la fibrine en Collagène.

B) *Le Collagène fibrillaire.*

A côté des substances amorphes mucopolysacchariques, de l'élastine et de la réticuline, nous considérerons le Collagène vrai. Sa mise en évidence est aisée grâce à des colorants appropriés dont les plus courants sont : le picro-ponceau (Collagène rouge), les bleus et les jaunes des méthodes trichromiques, la picro-fuchsine de VAN GIESON (Collagène rouge vif), les diverses hématoxylines au fer, à l'acide phosphotungstique (MALLORY : Collagène pourpre), à l'acide phosphomolybdique (VEROCAY) et surtout l'hématoxyline phosphomolybdique au dioxane de J. A. THOMAS (1941) [79] que nous avons employée seule ou associée à un colorant cytoplasmique, et qui donne une coloration « mauve » très fine des fibres collagènes. L'imprégnation argentique (BIELCHOWSKY) teinte le Collagène en brun et la réticuline en noir. Enfin, le Collagène ne donne jamais de réaction métachromatique avec les colorants spéciaux, tels que le bleu de toluidine, le violet de méthyl, le vert Janus et quelques autres étudiés par LISON [50] en 1935 (travaux de WISLOCKI, BUNTING et DEMPSEY, 1947 [87]).

Le Collagène se présente sous forme de fibrilles, plus ou moins longues, non anastomosées, qui, selon le tissu ou l'organe, constituent de fins réseaux (ganglions et rate) ou de petits faisceaux, eux-mêmes groupés en fibres plus importantes, les fibres tendineuses par exemple. A tous ces degrés existe autour des éléments collagènes, une gaine de substance amorphe parcourue de fines fibrilles (fibres névrogliques, réticuline) qui assure la cohésion des faisceaux et donne, lors du gonflement dans l'eau, l'aspect si particulier des colliers d'étranglement de la fibre. Cette pellicule

de mucopolysaccharides se sépare assez facilement des fibrilles collagènes dissociées et lavées plusieurs fois dans l'eau pure ou l'eau acidifiée ; il est impossible cependant de débarrasser complètement le Collagène de sa gangue et l'on obtient du Collagène « purifié » mais pas de Collagène pur (d'où la présence de traces de glucide dans les préparations de KANAGY par exemple). Peut-être existe-t-il aussi des liens chimiques entre les chaînes latérales du Collagène et les substances polysaccharidiques qui l'environnent.

Dans les tissus, les faisceaux de fibres collagènes, subissant des influences mécaniques variées, sont orientés selon des directions imposées par celles-ci : parallèles à l'axe des tendons, parallèles ou perpendiculaires à la surface du tégument, mais très souvent lâches et sinueux pour permettre le glissement entre les divers plans.

A l'état frais, la biréfringence des fibres collagènes les différencie des autres constituants fibrillaires du tissu conjonctif.

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DU COLLAGÈNE.

Pour les chimistes, le Collagène appartient aux scléroprotéines et répond à la définition d'un haut polymère d'acides aminés.

ASTBURY [3], en 1940, divise les protéides fibreux en deux groupes qui diffèrent par leurs diagrammes aux rayons X. Le premier groupe comprend la kératine, la myosine et le fibrinogène, caractérisés par leur élasticité ; le second groupe est composé des fibres du tissu conjonctif lâche, des tendons, des cartilages, des écailles et nageoires de poisson, des méduses et de la gélatine. Ces substances sont relativement inextensibles.

Les scléroprotéines sont insolubles dans l'eau, les acides et les alcalis dilués ; le Collagène, seul parmi elles, se transforme sous l'effet de la chaleur humide, en une masse amorphe : la gélatine, d'où son nom « Collagène » : « qui engendre la colle ». Cette transformation débute à une température variable, en général entre 60 et 65 degrés (température de dénaturation).

L'étude chimique de la constitution des chaînes aminées a fait l'objet d'études très poussées au cours de ces dernières années. Nous nous référerons en particulier à celles de Bowes et Kenten [14], 1948, de Cohn [21] et Edsall (1943), aux travaux de Schmitt, 1944 [75] et de Kanagy [47], surtout (1947). De leur lecture, on peut retirer les enseignements suivants :

a) *Composition chimique du Collagène.*

L'analyse du Collagène révèle une haute teneur en glycine, proline et hydroxyproline. Astbury et coll., en 1933, Astbury (1940 [2]), soulignent que la glycine représente le tiers du résidu, tandis que le proline et l'hydroxyproline en constituent à eux deux le second tiers, la troisième part étant représentée par un certain nombre d'autres amino-acides parmi lesquels l'on ne trouve ni cystine ni tryptophane.

Un tableau (tabl. 1) emprunté à Kanagy, résume la composition du Collagène telle qu'elle était admise en 1947 :

Tableau I

Acides aminés	*Pourcentage du poids sec de protéine*
Glycine	26,5 %
Alanine	8,7 %
Leucine	7,1 %
Proline	17,5 %
Hydroxyproline	14,4 %
Arginine	8,4 %
Lysine	5,9 %
Histidine	0,6 %
Ac. aspartique	3,5 %
Ac. glutamique	5,7 %
	98,1 %

Seule l'existence l'hedistidine (0,6 %) était alors discutée. Ce tableau montre la large prédominance de la glycine et des proline-hydroxyproline que tous les auteurs s'accordent à considérer comme étant les éléments essentiels du Collagène (Bergmann [10], Dakin [22], Grassmann [33-34]).

Plus récemment (1948), Bowes et Kenten [14] ont donné une analyse plus détaillée portant sur un Collagène de peau de bovidé ayant subi le minimum de traitement chimique (lavage à l'eau, passages successifs dans des solutions de NaCl à 10 %, lavage à l'eau distillée, déshydratation par l'acétone, élimination mécanique de la couche granuleuse, découpage en petits cubes, traités par l'éther de pétrole (trois fois), puis lavés à l'eau distillée et déshydratés par l'acétone). Le Collagène contient 99 % de protéine. Les résultats de l'analyse de Bowes et Kenten sont résumés dans le tableau II où l'on notera que figure un thio-composé (méthionine) et que de nouveaux acides aminés ont été identifiés (phénylalanine, isoleucine, thréonine).

Bowes et Kenten font remarquer que les analyses antérieures portaient sur des Collagènes traités par des procédés chimiques ou par des enzymes, et en partie modifiés par l'action de ces réactifs.

Tableau II

	Pourcentages.	
Amino-acides	*Bowes-Kenten*	*Graham-Waitkoff*
Glycine	26,3	»
Alanine	8,0	»
Leucine	3,2	3,5
Isoleucine		1,9
Valine	2,2	2,9
Phénylalanine	1,9	2,5
Tyrosine	0,6	0,9
Sérine	2,5	»
Thréonine	1,5	2,5
Méthionine	0,4	0,9
Proline	9,9	10,5
Hydroxyproline	9,2	»
Lysine	4,7	3,5
Arginine	15,3	8,0
Histidine	1,2	0,9
Ac. aspartique	3,6	6,9
Ac. glutamique	5,8	10,4
Azote amidé	3,5	»
	99,8	

En 1949, GRAHAM, WAITKOFF et HIER [32] comparent le contenu amino-acide de quelques scléroprotéines, leurs résultats pour le Collagène sont obtenus sur du tendon de bœuf dégraissé, débarrassé du tissu musculaire, lavé et séché. Les chiffres, que nous avons portés dans le tableau II, en face des chiffres de BOWES et KENTEN, sont différents ; il n'est pas fait état des taux de glycine et d'hydroxyproline, par contre, ces auteurs ont mis en évidence de la cystine en petite quantité (0,3 %). Il obtiennent pour la gélatine des pourcentages analogues. Le choix des méthodes de préparation du matériel d'analyse chez ces différents auteurs, suffit, sans doute, à expliquer ces légers écarts entre les pourcentages obtenus.

b) *Le gonflement du Collagène.*

Nous avons signalé que le Collagène soumis à l'action de l'eau offre la propriété d'augmenter de volume et se transforme en une masse gluante semi-translucide : c'est le gonflement. Etudié par LOEB [51], PROCTOR et WILSON, ce phénomène a été reconsidéré par PORTER et MAC LAUGHLIN, puis par BOWES et KENTEN [15].

Tous ces auteurs s'accordent à considérer que le maximum du gonflement se produit aux *p*H 2,4 et *p*H 12,5, donc en milieu très acide ou très alcalin, avec des valeurs minima pour des *p*H allant de *p*H 5,0 à *p*H 10,0. WILSON et GALLUM [87] ont montré que le minimum de gonflement se situe aux *p*H 5,1 et *p*H 7,6 (nous avons respecté ces valeurs pour notre expérimentation).

HIGHBERGER [42], sur des poudres de Collagène, a suivi graphiquement l'augmentation du volume en fonction du *p*H à 25° c., il arrive aux même conclusions que les précédents auteurs et montre que si l'on augmente la température, le Collagène se transforme peu à peu en gélatine.

D'après BOWES et KENTEN [15], le gonflement est dû à des facteurs osmotiques et surtout à une perte de cohésion des molécules de Collagène, ce mécanisme étant plus net dans les solutions alcalines. Cette perte de cohésion dépendrait de la rupture des liens intermoléculaires (« Hydrogen

bonds »), de la disparition des groupes amidés (la diminution de l'azote amidée est pour AMES, le fait essentiel du gonflement et de la transformation en gélatine) et peut-être aussi de la destruction des mucopolysaccharides qui, selon PARTRIDGE [66], cimenteraient entre elles les molédules de Collagène.

c) *Structure de la fibre collagène.*

Elle a été déduite en partie des propriétés optiques du Collagène et de l'étude de son *unité chimique structurale.*

Propriétés optiques :

Les études poursuivies à l'aide du microscope électronique et des rayons X ont permis d'élucider le problème de la structure du Collagène. Les premières recherches sont l'œuvre de W. T. ASTBURY [2] et de BEAR [7] et F. O. SCHMITT [75] en 1944.

La plupart des observations ont été faites sur des tendons qui se sont montrés le matériel le plus favorable en raison de leur structure fibrillaire bien orientée.

L'étude aux rayons X permet de voir : *a*) une diffraction équatoriale (E) d'environ 11 Å ; *b*) une diffraction méridionale (M) de 2,86 Å ; et *c*) une large zone de diffraction (L) (fig. 1).

L'espace équatorial correspond à la distance latérale entre les chaînes polypeptidiques, cette distance peut atteindre 15 Å et davantage si l'on soumet les fibres à l'action de l'eau, ce qui montre bien que lors du gonflement, l'eau se glisse entre les chaînes latérales des fibrilles. La zone méridionale correspondrait (interprétation la plus fréquente) à la longueur moyenne des résidus amino-acides le long de la chaîne. ASTBURY pense que les chaînes polypeptidiques sont disposées en lignes parallèles à l'axe des fibres, la longueur moyenne des résidus étant inférieure à celle des fibres de la soie (3,5 Å) ceci en raison de la haute teneur en proline et hydroxyproline qui font se contracter la chaîne.

La large bande de diffraction (L) correspond à l'axe de la fibre, et BEAR [7] a montré que ses dimensions sont de l'ordre de 640 Å.

Le microscope électronique permet de contrôler que les fibres de Collagène présentent le long de leur axe une alternance de disques clairs et de disques opaques. La distance moyenne qui sépare deux disques opaques est d'environ 640 Å, ce qui correspond au large espace de diffraction observé aux rayons X. La plus forte densité de ces disques opaques est probablement due à un agencement plus compact de la protéine (fig. 2).

Lorsque les fibres sont étirés, les disques clairs augmentent de longueur aux dépens des disques opaques. Il faut noter que si les tendons et les tissus riches en Collagène sont à peu près inextensibles. les fibrilles submicroscopiques isolées des tissus sont par contre très extensibles.

Les traitements que l'on fait subir au Collagène, influent sur le diagramme de diffraction, les dimensions du long espace de diffraction, qui correspond à l'axe fibrillaire, peuvent varier ainsi de 675 Å à 550 Å, celles de la zone équatoriale passent de 11,1 à 15,5 Å, la zone méridionale par contre ne se modifie pas ou très peu.

BEAR a soumis les tendons de kangourou, de bœuf et de rat à l'action de l'eau, de l'acide tannique, des sels de chrome et du formol à différentes températures. C'est le formol qui donne les modifications les plus nettes ; après le traitement, l'on voit l'espace de diffraction axiale passer de 670 Å à 550 Å. L'action de l'eau lui fait atteindre le diamètre maximum de 675 Å ; enfin, cet espace de diffraction disparaît avec le chauffage et le raccourcissement de la fibre collagène.

A la suite d'études faites sur la gélatine par BERGMANN et NIEMANN en 1936 et 1937, ASTBURY a appliqué les principes énoncés par ces auteurs au Collagène. Il en a déduit que la succession des amino-acides du haut polymère que constitue le Collagène, peut être schématisée ainsi :

- P - G - R - P - G - R - P - G - R -

où P représente la proline ou l'hydroxyproline, G la

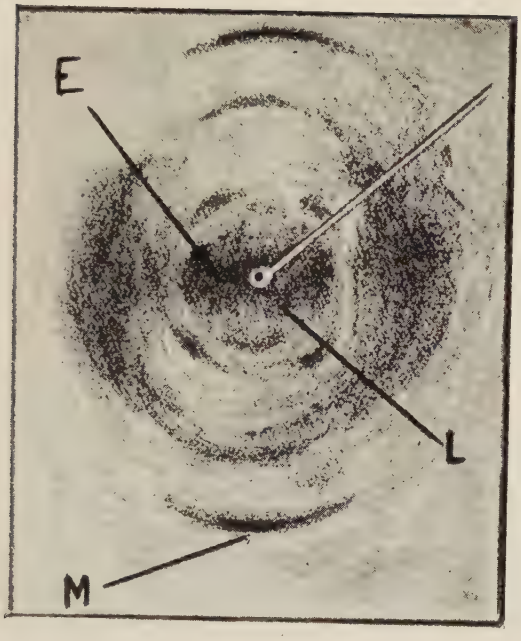
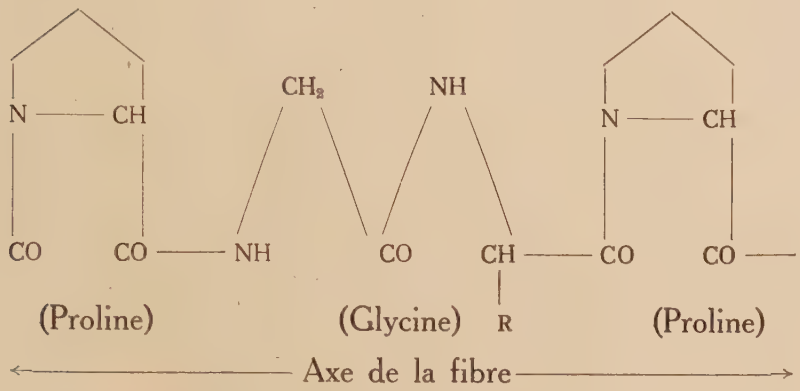


Fig. I - Schéma d'après Kanagy

Fig. II - Schéma d'après Kanagy

glycine et R l'un quelconque des autres acides aminés. ASTBURY [2] propose d'écrire la formule du Collagène de la façon suivante :



ASTBURY pense que les restes de proline et d'hydroxyproline se tiennent d'un côté seulement de la chaîne et il voit en cela une raison de l'inextensibilité des chaînes collagènes.

Il faut souligner que HUGGINS [44] a mis ces conclusions en doute et propose une configuration « spiralée » des chaînes aminées avec une disposition bi-latérale des prolines et hydroxyprolines (1943).

Unité chimique structurale du Collagène :

C'est à BEEK [8] que l'on doit la solution de ce délicat problème. Il a repris en 1932 les travaux de THOMAS et KELLY [78] mais sur un mode un peu différent. De l'étude de la combinaison de l'acide chlorhydrique au Collagène, à la gélatine et aux cuirs dans des conditions variables, il a pu déduire que la quantité d'HCl combinée dans chaque cas peut être exprimée par un facteur défini ou un multiple de ce facteur.

L'unité chimique qui se répète dans le polymère collagène semble être constituée de 38 atomes d'azote. Ce chiffre dérive de la réciproque du facteur 0,02638 qui est la moyenne des valeurs de f/a des résultats de BEEK ;

$$1/0{,}02638 = 37{,}91 \text{ ou } 38$$

dans ce rapport, « f » représente la fraction d'azote total combiné au HCl ; « a » représente le nombre entier exprimant la fraction relative combinée (voir le tableau des expériences de BEEK, tableau III).

TABLEAU III de BEEK. — *Valeurs de f/a.*
Adsorption du HCl gazeux par le Collagène et le cuir.

Matériel et conditions	*f* (1)	*f*/0106 (2)	*a* (3)	*f/a* (4)
Collagène, HCl pendant 151 jours	0,395	3,75	15	0,02647
Collagène, HCl pendant 45 jours	0,398	3,75	15	0,02647
Collagène, HCl pendant 45 j. puis mis en équilibre en présence de sodium pendant 49 jours	0,106	1,00	4	0,02650
Collagène, HCl déplacé par le sodium dans la précédente expérience	0,317	3,00	12	0,02642
Collagène, HCl à des pressions variées :				
12 mm.....	0,184	1,74	7	0,02629
30 mm.....	0,236	2,23	9	0,02622
Cuir, HCl à la pression de 15 mm.....	0,343	3,24	13	0,02638
Gélatine, HCl pendant 7 jours	0,633	5,97	24	0,02637
Gélatine chauffée à 180° C. pendant 2 j. puis chauffée avec HCl pendant 7 j....	0,106	1,00	4	0,02650

(1) Fraction de l'azote total combiné.
(2) Facteur combiné le plus bas.
(3) Facteur exprimant la fraction combinée relative.
(4) La moyenne des valeurs de $f/a = 0{,}02638$.

Prenons un exemple concret dans ce tableau de BEEK donné par KANAGY [47] :

Le Collagène mis en présence d'HCl pendant 151 jours donne une valeur de f égale à 0,395.

Le rapport $f/0{,}106$ (facteur combiné le plus bas) = 3,75.
a à une valeur de 15.
D'où $f/a = 0{,}02647$.

THOMAS et KELLY [78] en 1928, avaient déjà effectué des recherches analogues en faisant agir, non pas du HCl mais du chrome et du fer. Ils arrivent en faisant le rapport f/a à des valeurs proches de 38. Les travaux de Beek ont donc confirmé ceux de THOMAS et KELLY.

Poursuivant ses recherches BEEK a trouvé que trois atomes d'azote parmi les 38 de l'unité chimique du Collagène appartiennent à des groupes moins fortement basiques que les autres. Le poids apparent équivalent du Collagène correspondant à cette valeur, si on le calcule sur la base de 17,86 % d'azote, est alors voisin de 1.000.

Azote aminé du Collagène :

KANAGY et HARRIS [47] ont étudié la teneur en azote aminé du Collagène par la réaction à l'acide nitreux :

$$H\,N\,O_2 + R\,N\,H_2 \rightarrow R\,O\,H + H_2\,O + N_2$$

Le volume d'azote dégagé permet de déterminer le nombre des groupes aminés dans la molécule de Collagène. Le détail de l'expérimentation basée sur la vitesse de dégagement de l'azote, serait trop long à exposer ici, nous nous bornerons donc à résumer les conclusions de cette étude. L'unité chimique de BEEK est bien constituée de 38 atomes d'azote. Mais il semble bien qu'il y ait deux restes d'arginine et un de lysine.

Des résultats analytiques de ces auteurs on peut déduire que les 38 atomes d'azote correspondent à 31 acides aminés ainsi répartis :

Arginine	2 (2 fois 4 atomes d'azote)
Lysine	1 (2 atomes d'azote)
Glycine	12
Proline hydroxyproline	8
Ac. aspartique	1
Ac. glutamique	1
Alanine	4
Leucine	2
	31

L'unité de BEEK ne contient pas d'histidine ni de glucides ou tout au moins l'analyse n'a pas permis d'en déceler jusqu'ici. Si ces substances existent, elles ne sont qu'à l'état de traces infimes.

Notons que GRASSMANN et SCHLEICH [33] ont mis en évidence du glucose dans la gélatine. BEEK, par ailleurs, a pu trouver par analyse spectrophotométrique 0,47 % de résidu hydrocarboné où le glucose et le galactose sont unis entre eux par une liaison que l'hydrolyse ne rompt que difficilement. Mais les polysaccharides ne rentrent pas dans l'unité chimique structurale du Collagène qui est essentiellement protéidique comme on vient de le montrer, ils appartiennent vraisemblablement au magma muco-polysaccharidique que nous avons envisagé dans le paragraphe A.

En définitive : Le Collagène, élément fibrillaire de la substance fondamentale du tissu conjonctif, est un haut polymère d'acides aminés. L'analyse des échantillons les plus purifiés ne livrent jamais que des résidus azotés. La simple attaque au *kjeldhal* donne des teneurs allant de 80 à 92 % de protéine, exprimée en azote total multiplié par le coefficient 6,3 qui est le chiffre moyen d'azote dans les amino-acides. Nous aurons l'occasion d'y revenir.

Nous nous sommes étendus sur les notions nouvelles concernant la composition et la structure du Collagène, cette insistance trouvera sa justification dans l'analyse que nous ferons du Collagène A de NAGEOTTE et Mlle L. GUYON, utilisé comme réactif des Collagénases par quelques microbiologistes. Ce réactif, on le comprendra plus aisément, ne peut être considéré comme satisfaisant pour la recherche de ces enzymes qui, théoriquement, ne doivent lyser que le Collagène véritable.

LE COLLAGÈNE « A »

Dans une série de publications commencée en 1932, J. NAGEOTTE, puis J. NAGEOTTE et L. GUYON [59] ont

rapporté leurs observations sur la structure des tendons et ce qu'ils ont appelé le « Collagène dissous » dans un acide dilué.

Les premières recherches furent effectuées sur le tendon de queue de rat, « cet objet, disent les auteurs, présente des facilités qui ont permis à l'un de nous (J. NAGEOTTE) de constater la solubilité d'une fraction du tissu tendineux dans les acides dilués. Dans tous les acides minéraux ou organiques, sauf ceux qui ont un pouvoir fixateur, l'acide acétique a été le plus souvent choisi pour l'étude morphologique du caillot fibrillaire, dans l'espoir qu'il altérerait moins la substance extraite ; et de fait, des solutions acétiques de Collagène ont été trouvées intactes, ou à peu près, au bout d'un an. Tandis qu'il se produit assez rapidement des modifications importantes dans les solutions obtenues à l'aide d'acides forts, tels que HCl, comme on le verra plus loin... »

La queue de rat reste donc pour ces auteurs le matériel idéal. Les tendons de chien ou de lapin ne livraient pas de Collagène dissous ou du moins il fallait leur imposer un traitement particulier et « encore ce Collagène était-il très différent, au point de vue morphologique, de celui obtenu directement du tendon de rat par l'action d'un acide » ; « pour distinguer les deux sortes de Collagène, on les a désigné par les lettres A (Collagène obtenu directement en solution acide) et B (Collagène obtenu en solution acide après traitement par un alcali). Les tendons de pied de bœuf n'avaient rien donné ».

J. NAGEOTTE et L. GUYON considèrent le Collagène dissous comme du Collagène presque pur et la fibrille anatomique est pour eux un complexe formé de microcristaux de substance collagène. Après l'action des ferments protéolytiques, ils n'obtiennent plus de Collagène A, mais parfois du Collagène B qui serait du Collagène dépolymérisé.

Le Collagène A ne peut être tiré que de très jeunes tendons, les tendons adultes ne livrent rien en solution et sont dits « réfractaires ».

Si l'on poursuit la lecture de ces travaux, l'on y voit que la solution acide de Collagène contient vraisemblablement la protéine sous forme d'un sel, dissous dans un excès d'acide ; après dialyse contre de l'eau distillée, il se forme une gelée considérée comme une gelée de Collagène. On l'obtient par désacidification de toutes les solutions de Collagène lorsqu'elles ne sont pas altérées.

Suivent alors les descriptions microscopiques du Collagène A : il présente des aspects très variés, pseudocristalloïdes ou pseudofibrillaires en fibres longues ou courtes et prenant des colorants tels que l'orcéïne qui ne teinte pas le Collagène des tissus.

Malheureusement, aucune étude chimique, aucune analyse qualitative ou quantitative n'a été faite ; pas même une réaction spécifique des protéines ou un taux d'azote. Toutefois, NAGEOTTE et L. GUYON estiment que le Collagène A, proche parent de la fibrine, est une « protéine plastique, grâce à sa sensibilité à une foule de facteurs, qui actuellement nous échappent pour la plupart » (1938).

On comprendra donc d'après le résumé de ces études, que le Collagène A ne peut être considéré comme du Collagène. Nous sommes en effet très loin de ce haut polymère d'acides aminés rigoureusement insoluble dans l'eau et les acides ou alcalis dilués et tel que nous l'avons décrit au début de ce premier chapitre.

Pour toutes ces raisons, nous avons proscrit le Collagène A de notre expérimentation. Les analyses chimiques que nous avons faites de cette substance viendront dans un instant justifier encore notre opinion.

LA PRÉPARATION DU COLLAGÈNE.

Instruits de la constitution du Collagène, de sa nature et de la place qu'il occupe dans l'organisme, on peut envisager les modes de préparation du matériel qui servira à la détection des Collagénases.

La technique de préparation du Collagène « purifié » sera donnée en détail. Nous terminerons en indiquant pour mémoire seulement, le mode d'obtention de *l'azocoll* et du Collagène A de NAGEOTTE.

1° *Collagène purifié.*

La matière première.

Le Collagène est présent en plus ou moins grande abondance dans tous les territoires de l'organisme, mais il sera plus avantageux pour l'isoler de s'adresser aux tissus qui en sont les plus riches : la peau, les tendons et les membranes chorio-amniotiques du fœtus.

Les tendons de la queue des petits animaux offrent un matériel particulièrement propre et facile à purifier, seul un revêtement endothéliforme enveloppe les fibres et ne gêne en rien leur dissociation. De plus, le tendon de queue de rat ne contient pas de fibres élastiques qu'il faudrait éliminer ; les ligaments articulaires sont, par contre, très riches en éléments élastiques, nous n'en avons pas fait usage. Les aponévroses, les capsules viscérales, la sclérotique, la dure-mère, le derme et le chorion des muqueuses constituent un matériel excellent par la densité et la facilité d'extraction de leur Collagène. Nous n'avons, en somme, que l'embarras du choix et si l'on ne dispose pas de rats, les animaux de boucherie constituent une source inépuisable de peaux, de tendons et d'aponévroses. Nous avons de même de bons réactifs avec le cordon ombilical et les membranes placentaires. Nous avons abandonné la peau de bovidé qui nécessite trop de manipulations du fait de ses nombreuses souillures et de la difficulté d'élimination de sa couche papillaire très épaisse.

Les tendons de queue de rat, que nous avons obtenus en grande quantité au Laboratoire de la Faculté de Médecine de Bordeaux (que M. le Professeur MAYER trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude), les tendons de pattes postérieures de bovidés, les aponévroses et les

membranes fœtales ont donc constitué l'ensemble de notre matière première.

Technique.

Il existe plusieurs procédés de préparation du Collagène, tous basés sur l'élimination dans le tissu choisi de tout ce qui n'est pas du Collagène. Nous sommes loin, là encore, de la méthode de NAGEOTTE et L. GUYON qui, au contraire, élimine le Collagène.

Nous avons, dans l'ensemble, suivi les techniques de HIGHBERGER [42], 1936, et de BOWES et KENTEN [14], 1948.

Les tendons ou autres organes sont d'abord débarrassés des tissus voisins : muscle, graisse, etc..., dilacérés en fines lanières et lavés à grande eau. Essorés sommairement, ils sont ensuite placés dans une solution d'acide acétique à 1/10.000 où ils gonflent pendant 24 heures à la glacière.

On les soumet le lendemain à la digestion pepsique à *p*H 3 à 37° pendant une dizaine d'heures. Un lavage à grande eau débarrasse le magma obtenu des impuretés ; on essore au papier buvard, on plonge dans l'alcool à 95°. Le Collagène désormais seul présent, est alors déshydraté par l'acétone ou plus simplement séché à l'étuve après étalement au rouleau en un parchemin aussi mince que possible. Celui-ci sera ensuite découpé en petits fragments. Un autre procédé consiste à laisser sécher la masse de Collagène sans l'écraser, on en retirera de fines lanières très faciles à détacher les unes des autres. Le Collagène ainsi obtenu est stérilisé dans l'éther sulfurique pendant 24 heures, puis placé dans de petits flacons stériles où ils se conservent indéfiniment. Il est prêt à l'emploi.

2° *La poudre de Collagène.*

Certains auteurs ont proposé de préparer des poudres de peau et de fixer sur elles un colorant azoïque par copulation. Cela permet d'obtenir un réactif connu sous le nom d' « *azocoll* » que l'on met en suspension dans le filtrat où l'on veut déceler les Collagénases. Si l'enzyme est présent,

il attaque la poudre de peau et libère le colorant qui diffuse dans le milieu et le teinte en rose.

Ce Collagène semble en partie dénaturé. Il a, en effet, donné des résultats très contradictoires et ne paraît pas spécifique. En sa présence *Welchia perfringens* sécréterait une Collagénase.

3° *Le Collagène A.*
(J. Nageotte et L. Guyon, A. Delaunay)

Des tendons de queue de rat sont dilacérés en fines fibrilles que l'on fait macérer pendant 24 à 48 heures dans une solution d'acide acétique à 1/10.000. Le matériel gonfle considérablement et devient gélatineux. On filtre et on élimine la masse retenue. Le liquide filtré est alors additionné d'un volume égal d'une solution de chlorure de sodium à 2 %. Peu à peu se forme un précipité qui est le Collagène A. On peut alors le recueillir soit par dialyse (Delaunay [24]) contre eau distillée, soit plus rapidement par centrifugation à faible vitesse ou sur un filtre. Lavé et séché, il est découpé en petites pastilles dites de « papier de Collagène », que l'on stérilise à l'éther. Ces pastilles se dissolvent spontanément en milieu acide (*p*H 4) et semblent être dénaturées par un contact trop prolongé avec l'éther.

On voit immédiatement que la substance éliminée n'est autre que le Collagène et que le coagulum formé sous l'ingluence du Nacl ne peut être considéré comme du Collagène puisque celui-ci est insoluble en eau acidulée.

Analyse des différents collagènes.

1° *Aspect microscopique et colorabilité.*

Collagène véritable.

Le microscope à contraste de phase a montré la structure fibrillaire caractéristique avec, çà et là, quelques restes nucléaires (noyaux de cellules tendineuses).

Après coloration, les fibrilles prennent toutes soit l'hématoxyline phosphomolybdique au dioxane de J.-A. Thomas [79] qui les teinte en violet, soit le rouge vif du picro-ponceau. Le séjour de 24 heures dans l'orcéine ne permet pas de mettre en évidence la moindre fibre élastique.

Histologiquement, nous sommes donc bien en présence de Collagène.

Collagène A.

Le microscope à contraste de phase nous montre des formations pseudofibrillaires ou de véritables chaînes de corpuscules arrondis, tout à fait comparables à ceux décrits par Nageotte et L. Guyon. L'hématoxyline au dioxane et l'orcéine ne colorent pas, ou très mal, ces formations.

Histologiquement, le terme de Collagène reste donc douteux.

2° *Propriétés.*

Notre réactif était toujours insoluble dans l'eau, les acides et les alcalis dilués, mais soluble dans l'eau à 60-65° et transformé alors en gélatine.

3° *Analyse chimigue.*

Nos analyses ont été conduites de deux façons :

a) Caractérisation de protéine ou analyse qualitative :

	Collagène purifié	*Collagène A*
	—	—
Réaction du Biuret	+	0
Réaction à la ninhydrine .	++	très faible ou nul
Réaction Xanthoprotéique	++	très faible ou nul

b) Détermination du taux d'azote total au Kjeldhal :

Collagène purifié :

Un fragment très exactement pesé et sec est placé dans un matras de Kjeldhal. On ajoute 3 cc. d'acide sulfurique

concentré R.P. + un cristal de sulfate de cuivre et un peu de sulfate de potassium.

On place le matras au-dessus d'un bec bunsen, à feu modéré et on absorbe les vapeurs à la trompe de GUILLAUMIN. On laisse se poursuivre l'attaque jusqu'à ce que le liquide soit parfaitement limpide (3 à 5 heures).

L'azote dégagé est alors dosé en NH_3 par l'acide sulfurique selon la méthode classique.

Résultats :

	$\frac{N\ \% \times 6,3}{—}$
Collagène de peau de bœuf.....	79 % et 74 %
— tendon de veau	65,5 %
— tendon de queue de rat	91,9 %
— cordon ombilical	82,6 %
— membranes fœtales	92,3 %

(6,3 représente le taux moyen d'azote dans les acides aminés.)

Collagène A :

Taux d'azote indosable (trois essais infructueux).

Pour le Collagène A nous avons recherché en outre la présence de polysaccharides, le résultat a été : réaction douteuse. La mise en évidence des protéines par l'acide trichloracétique a été tentée sur le liquide de macération non précipité par le chlorure de sodium ; nous avons obtenu environ 0,12 % de substance précipitable. Donc, très faible quantité de protéine correspondant, sans doute, aux protéines du sang ou de la lymphe dissoutes dans le liquide acétifié lors de la macération du tendon.

Le Collagène purifié présente, par contre, toutes les caractéristiques du Collagène véritable, caractéristiques aussi bien histologiques que physico-chimiques.

Nous rejetterons donc le Collagène A qui ne mérite plus le nom de Collagène et nous rechercherons sur du Collagène véritable l'attaque des enzymes. Si de tels ferments lytiques existent, ils mériteront le nom de « Collagénases ».

Chapitre II

LA DÉTECTION DES COLLAGÉNASES CHEZ LES ANAÉROBIES

1° *Historique des Collagénases.*

Le réactif étant défini, les protéinases bactériennes capables de désintégrer le Collagène seul, doivent être appelées « *Collagénases* », et la nature sans ambiguïté du Collagène ne permet pas d'étendre cette qualification à de trop nombreux enzymes.

Or, c'est à propos de gélatinases que, pour la première fois, en 1938, Maschmann [56] a créé le terme de Collagénase pour des enzymes protéolytiques des filtrats de *Welchia perfringens.*

Leur existence, cependant, était soupçonnée depuis longtemps déjà, par Henry (1923), par Weinberg et Randin [83] (1931-1932) qui décrivaient un ferment fibrolytique chez deux germes : *Bacillus histolyticus* et *Bacillus anthracoïdes* et les différenciaient des autres ferments protéolytiques, des gélatinases en particulier, sécrétés par de nombreux autres germes anaérobies et aérobies (*sporogènes, putrificus, bifermentans, perfringens, œdématiens, vibrion septique et staphylocoques, pyocyaniques, dysentériques, coliformes, protéus*).

En 1937, Weinberg, Nativelle et Prévot [84] soulignaient l'atteinte exclusive du tissu conjonctif dans les lésions musculaires de la gangrène gazeuse, contrastant avec

l'intégrité des fibres musculaires dissociées mais non altérées ; avec DERNBY et BLANC [25] (travaux de 1921), ils comparaient cette diastase à la trypsine et précisaient (après WEINBERG et RANDIN) certaines modalités et limites de ses effets (influence de la chaleur, de la filtration, de l'état du substrat après action des acides ou des alcalis, activation par l'adjonction de glucose).

MASCHMANN, la même année, publie ses travaux et en 1938 abandonne le terme de Collagénase qui ne réapparaîtra qu'une fois la période de guerre terminée. Au cours de celle-ci, l'investigation des protéinases des germes aérobies et anaérobies se poursuit mais se borne à l'étude du pouvoir gélatino-lytique que l'on compare aux propriétés escarrifiantes des mêmes germes. Ce sont les travaux de POZERSKI et Mme GUÉLIN [72] (1938), de WEIL, KOCHOLATY et SMITH [86] qui en 1939, étudient le pouvoir activateur des composés à groupes — SH et des métaux lourds (couple cystéine - Fe^{++}) et précisent qu'il s'agit de protéinases et non de peptidases. Enfin Maylis GUILLAUMIE [36], en 1941, recherche les conditions optima de l'action gélatinolytique du bacille *perfringens* type A.

Par ailleurs, d'autres éléments des toxines microbiennes sont identifiés, leur mode de production et leurs propriétés approfondies : facteurs de diffusion de sources diverses : l'hyaluronidase (MADINAVEITIA, 1938-39-40 [55], MAC CLEAN et HALE [53], 1941), facteur léthal, facteur nécrosant, lécithinases, hémolysines (M. GUILLAUMIE, A. KREGUER, FABRE [37], MACFARLANE et KNIGHT, 1941), ainsi que le pouvoir antigénique de ces mêmes toxines.

En 1945, la question des Collagénases est reprise par plusieurs auteurs, les uns se préoccupant de savoir par quel mécanisme se produisent les lésions de la gangrène gazeuse, les autres faisant agir *in vitro* la toxine sur du muscle et du Collagène « purifié ». MACFARLANE et MAC LENNAN [54], dans un article intitulé « The Toxoemia of Gas Gangrene », montrent l'indépendance réciproque des divers phénomènes : atteinte de l'état général, hémolyse, destruction du muscle, libération de graisses dans le foyer de nécrose.

Ils pensent que si le muscle est dissocié (les fibres musculaires restent intactes contrairement à ce qui se passe avec la trypsine), c'est le fait d'un enzyme qui détruit le tissu conjonctif du muscle, les lésions de la peau susjacentes (phlyctènes) reconnaissant la même origine. MACFARLANNE et MAC LENNAN concluent que le pouvoir d'extension du processus de gangrène est dû à la Collagénase, mais ils ajoutent : « nous n'avons pas de preuve évidente de son existence comme entité séparée de la lécithinase et de l'hyaluronidase ; mais le fait que le calcium ne lui est pas nécessaire et que les solutions d'hyaluronidase sont sans action sur le Collagène, incline à penser qu'elle est distincte de ces deux enzymes ». Les toxines expérimentées provenaient de souches de *Clostridium Welchii*.

ROBB SMITH [74] dans son travail sur les changements tissulaires produits par les filtrats de *Welchia perfringens* type A, fait des constatations analogues, mais son étude histologique est plus poussée : à la périphérie de la région atteinte, il y a peu d'altérations de la réticuline et des fibres collagènes qui apparaissent largement séparées les unes des autres, comme s'il y avait disparition de la substance amorphe qui les entoure normalement ; dans la zone centrale, les fibres de réticuline sont moins nombreuses et plus fines, les fibres collagènes ont partiellement disparu ou sont très amincies. Dans les deux cas, myofibrilles et fibres élastiques sont intactes mais dissociées. Après avoir essayé de distinguer, d'une manière toute hypothétique, les rôles respectifs des différents enzymes du filtrat, ROBB SMITH souhaite que l'on puisse étudier séparément les éléments de cette « bouillabaisse » d'enzymes.

C'est à JENNISON [45] (1945) que revient le mérite d'avoir le premier employé le Collagène purifié (à 99 %). Son travail porte sur des germes aérobies et anaérobies, tous gélatinolytiques, qu'il fait agir dans le milieu de culture sur du Collagène stérilisé à la chaleur sèche. La lecture des résultats consiste à observer la désintégration des fragments de Collagène dans les tubes de culture. Il obtient ainsi des effets collagénasiques avec trois germes aérobies (*Bacillus*

Brevis, *Bac. Mycoïdes* et *Bac. Mesentericus*) et quatre germes anaérobies (*Clostridium histolyticum*, très actif, *Cl. lentoputrescens*, plus lent, *Cl. sporogenes* et *Cl. bifermentans*, très peu actifs). Il remarque que dans le milieu au thioglycollate l'activité est plus forte que dans le milieu au muscle cardiaque de bœuf. JENNISON confirme ainsi les résultats de WEIL, KOCHOLATY et SMITH (1939) (composés à groupes — SH). En 1947, ce même auteur [46] étudie plus spécialement *Clostridium histolyticum* dont l'activité est mesurée sur une fine suspension de tendon de bœuf stérilisé ou non stérilisé et dont le poids sec est déterminé avant et après le contact avec le filtrat. Les filtrats de culture de 24 heures sont les plus actifs et détruisent de 60 à 90 % du Collagène, suivant le temps de contact : de 24 à 96 heures.

La liste d'anaérobies producteurs de Collagénases donnée par EVANS [28] en 1947, ne concorde pas avec celle de JENNISON. *Cl. histolyticum* est toujours le plus actif, *Cl. welchii* type A en produit un peu, *Cl. sporogènes* et *Cl. bifermentans* sont de faibles producteurs ; il n'est pas question de *Cl. lentoputrescens*. Mais EVANS fait agir ces germes sur de la « poudre de peau » en suspension dans de la gélose. Sa désintégration, dit-il, n'est pas une indication spécifique de la présence de Collagénase, mais donne une « présomption raisonnable ». EVANS fait remarquer en outre que ce sont les clostridiacées les plus productrices de Collagène *in vitro*, qui donnent les lésions les plus importantes. Cependant, ces mêmes souches ne sont pas obligatoirement mortelles, il y a dissociation entre pouvoir léthal et pouvoir collagénasique.

La toxine de *Clostridium œdématiens* (*Cl. Novyi*) qui possède six composés antigéniques différents, n'a pas montré de pouvoir collagénolytique dans l'expérimentation de OAKLEY, WARRACK et CLARKE (1947) [63].

TODD (1947) [80] étudie la protéinase du streptocoque hémolytique qu'il met en présence d'azocoll et de protéine musculaire. Cette protéinase, concentrée par le sulfate d'ammonium, est présente dans tous les filtrats. FROBISCHER appelait, en 1926, cet enzyme « histase » et le disait spécifique

pour la protéine du muscle. SEEGAL et SEEGAL (1936) découvraient qu'il était capable d'attaquer aussi le tissu rénal. Son action sur l'azocoll ne peut donc suffire à lui faire décerner le titre de Collagénase.

OAKLEY, WARRACK et VAN HEYNINGEN (1946) [62] distinguaient plusieurs antigènes dans les filtrats de *Cl. Welchii*; à l'un d'eux, capable d'attaquer le papier de Collagène, la poudre de peau et l'azocoll, ils donnaient le nom de « K toxine ». En 1948, BIDWELL et VAN HEYNINGEN [12] réussissent à obtenir cette Collagénase libre et dans un état de haute pureté, disent-ils. Ils lui accordent en outre une grande spécificité, car elle ne dissout que le Collagène et la gélatine. Ces auteurs définissent deux unités : l'unité K par centimètre cube de filtrat, qui correspond au taux de Collagénase, et l'unité Q par centimètre cube de filtrat, qui correspond à l'activité enzymatique de la K toxine. Ils exposent leur méthode de purification (précipitation par sulfate d'ammonium, adsorption sur phosphate de calcium, sur charbon de bois et sur poudre de peau) et les conditions d'action de l'enzyme purifié : *p*H optimum (6,0 à 7,5), stabilité dans une solution tampon au borate et instabilité dans un tampon au phosphate, stabilité aux *p*H alcalins et neutre et non aux *p*H acides, inactivation par un chauffage de cinq minutes à 80° C., influence des ions métalliques : Cu, Hg, Mn, Co, Fe, qui sont inhibiteurs, Mg et Zn qui sont sans effet. Mise en présence de substrats divers, la Collagénase n'a pas agi (hémoglobine, caséine, sérum de cheval normal ou dénaturé, sulfate de clupéine). L'existence d'anti-Collagénase est confirmée dans les sérums anti-welchii et les auteurs discutent la nature enzymatique de la Collagénase : ce n'est pas une peptidase, elle n'attaque pas les principaux acides aminés du Collagène (proline et hydroxyproline) ; cependant, elle libère des acides aminés que l'on peut doser dans les filtrats (mise en évidence de l'attaque du substrat). BIDWELL et VAN HEYNINGEN n'apportent cependant pas de conclusions à ce problème du mécanisme collagénasique.

Ethel BIDWELL [13] reprend en 1949 ses expériences sur la K toxine et montre qu'un *p*H alcalin (*p*H 8,5) et un

chauffage à 50° pendant dix minutes font disparaître le pouvoir de désintégration du muscle et du papier de Collagène, tandis que l'action sur l'azocoll et la poudre de peau n'est annihilée que par un *p*H de 10,5 et une température de 60°. Dans le premier cas, un nouvel enzyme apparaîtrait, issu de la dénaturation de la Collagénase ou d'un autre « précurseur » présent dans le filtrat.

Les *Annales de l'Institut Pasteur de Paris* publient, en 1949, les premiers travaux français sur les Collagénases, ceux de M. DELAUNAY, M. GUILLAUMIE et A. DELAUNAY [24]. La méthode de mise en évidence des Collagénases préconisée est à base de Collagène A de NAGEOTTE et L. GUYON qui sert de substrat. L'expérimentation porte principalement sur *Clostridium welchii* et ses différents types (A, B, C, D, E, F), sur diverses toxines nécrosantes et le venin de *Vipera aspis*, enfin sur *Cl. histolyticum*, *Cl. sporogènes* et quelques germes de l'air. Les filtrats sont obtenus à partir de cultures de 24 heures dans du bouillon VF glucosé à 1/1.000 et additionné parfois de sang desséché (1,5/1.000) ou de foie cuit. Les auteurs étudient aussi des toxines de *Welchia perfringens* (type B, C, D) précipitées et desséchées, quelques-unes de préparation ancienne. Les pastilles de Collagène A sont mises en présence des filtrats et des toxines pures ou diluées dans du sérum physiologique et la lyse est observée après séjour à l'étude à 37°. Les résultats obtenus par DELAUNAY sont : activité collagénasique des souches de *Cl. welchii* type A, C, D et E, et des souches de *Cl. histolyticum*. Le venin de vipère concentré attaque aussi le Collagène. Les types B et F de *Cl. welchii*, le *Cl. sporogènes* et les toxines dermo-nécrosantes du bacille diphtérique et du staphylocoque se sont montrés dépourvus d'action sur le papier de Collagène. Enfin, la fibrinolysine du staphylocoque a permis à DELAUNAY de différencier la fibrine et le Collagène qui, d'après NAGEOTTE et L. GUYON, étaient de même nature.

Simultanément, ces auteurs étudient la stabilité des Collagénases de *Cl. welchii* en fonction du vieillissement (l'activité persiste un mois à + 4°), de la chaleur (atténua-

tion ou disparition après chauffage à 100° pendant 30 minutes), de l'action de certaines substances (le formol atténue la Collagénase), et des sérums antiperfringens qui donnent une inhibition spécifique pour chaque souche.

DELAUNAY envisage le rôle des Collagénases en pathologie et démontre qu'elles ne sont pas des facteurs de diffusion en injectant sous la peau de cobayes une suspension d'encre de Chine dans la toxine diluée : il n'y a pas de diffusion du colorant. Leur emploi thérapeutique est suggéré, mais des expériences sur le rat se sont soldées par une mortalité considérable des animaux injectés et par des résultats peu probants chez les rats demeurés en vie.

OAKLEY [64] en 1949 et 1950 (OAKLEY et WARRACK [65]) étudiant les complexes enzymatiques des clostridies, de *Cl. histolyticum* en particulier, fait la critique des divers réactifs employés. Pour lui, le ramollissement du muscle frais et la dissolution du papier de Collagène sont seuls spécifiques. Il considère que la poudre de peau et l'azocoll sont des Collagènes altérés et que leur désintégration par des enzymes inactifs sur le Collagène véritable suffit à les faire rejeter pour l'étude des Collagénases. Il précise, à propos de la K toxine du *Cl. welchii* qu'elle est en même temps une gélatinase, les deux propriétés étant indissociables.

L'activité collagénolytique de la papaïne est comparée à celle de *Cl. histolyticum* de *Cl. perfringens* par NEUMAN et TYTELL (1950) [61], qui n'obtiennent aucune attaque de plusieurs échantillons de Collagène par la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine, qui digèrent, par contre, la poudre de peau, confirmant le défaut de spécificité de celle-ci. De même, le Collagène dénaturé par l'urée ou par la chaleur (68°-70°) se laisse dissoudre par tous ces enzymes, il a perdu ses caractères propres pour se transformer en une substance intermédiaire entre lui et la gélatine (?).

TYTELL et HEWSON [81] étudient, enfin, quelques propriétés de la Collagénase de *Cl. histolyticum* : son activité n'est pas influencée par les ions Fe ++ et par la cystéine, elle est inhibée par l'antisérum spécifique sans qu'il y ait

de rapport entre cette inhibition et le pouvoir antitoxique du sérum (indépendance complète du pouvoir toxique et du pouvoir collagénasique). Certains sérums normaux concentrés paraissent avoir le même effet que l'antisérum spécifique. L'activité de la Collagénase est paralysée par des composés actifs sur les groupes « amino » et « sulfhydryl », et par les métaux lourds. En solution diluée, elle perd son activité après chauffage à 50°. TYTELL et HEWSON notent pour terminer que l'inhibiteur spécifique de la trypsine, présent dans le sérum sanguin, n'a aucune influence sur l'activité de la Collagénase ; c'est un fait nouveau qui vient préciser la notion de différence de nature entre ces deux enzymes.

A la suite de ces nombreux travaux, nous aurions pu penser qu'il était superflu de vouloir ajouter quelque chose. Cependant, les Collagénases existent-elles réellement? Il y a trop de résultats contradictoires parmi ceux que nous avons énumérés. Nous avons montré d'autre part qu'il est très difficile, sinon impossible, d'obtenir du Collagène pur et que les enzymes qui détruisent les substances cimentantes (mucopolysaccharidases) suffiraient, d'après certains auteurs, à provoquer la dislocation des fibres collagènes. Mais le *Clostridium histolyticum* ne possède pas de tels enzymes et dans l'expérimentation personnelle que nous allons développer maintenant, il est le seul germe qui se soit montré capable de lyser le Collagène purifié. L'enzyme responsable de cette activité très spéciale peut donc, jusqu'à nouvel ordre, mériter le titre de Collagénase.

2° *Expérimentation.*

Nous avons vu que certains germes aérobies ont été catalogués producteurs de Collagénase, *Bacillus mycoïdes* en particulier, étudié par JENNISON [45] en 1945. Nous laisserons de côté ces bactéries aérobies pour nous consacrer aux germes de la gangrène gazeuse chez lesquels le pouvoir collagénasique a été le plus étudié.

Souches mises en expérience.

Toutes nos souches provenaient de collections officielles : soit du Centre International des Collections Microbiennes (Professeur HAUDUROY, Lausanne), soit de l'Institut Pasteur de Paris, soit enfin de la Collection d'Oxford.

Ont été étudiés les germes suivants :

Welchia perfringens type A (4 souches) ;
Clostridium histolyticum (3 souches) ;
— *sporogenes* (2 souches) ;
— *œdematiens* (variété *Novyi*) (2 souches) ;
— *aerofœtidum* (1 souche) ;
— *septicum* (2 souches) ;
— *bifermentans* (1 souche).

Méthode de culture des souches anaérobies.

J. BRISOU et R. BABIN [17 et 18] ont mis au point en 1949-1950 un milieu particulièrement pratique pour cultiver les anaérobies. Le milieu V.F.P. (viande - foie - digestion papaïnique) très simple à préparer, nous a permis pendant tout le cours de notre travail d'obtenir très rapidement et pour toutes les souches employées, des cultures florissantes et à haut pouvoir toxique ou collagénasique lorsque le cas s'en est présenté.

Le mode de préparation du milieu V.F.P. est le suivant :

— Bien mélanger :
Viande finement hachée..... 500 gr.
Foie de bœuf ou de veau ..... 500 gr.
Eau ..... 2 litres
— Chauffer à 80° pendant 10 minutes.
— Refroidir à 37° et ajouter 1 gr. de papaïne en poudre.
— Laisser la digestion se faire pendant 4 heures entre 37 et 40°.
— Arrêter la digestion en portant à l'ébullition.
— Autoclaver à 120° pendant un quart d'heure.
— Filtrer et ajuster le *p*H à 7 ou 7,5.
— Enfin répartir en tubes et stériliser.

Dans ce milieu très simple, les auteurs ajoutaient de l'acide succinique (milieu V.F. succinate), leurs recherches les ont conduits à le supprimer, l'analyse du bouillon ayant montré qu'il en contient naturellement jusqu'à 1 %. Notons enfin qu'il est bon de régénérer ce milieu tous les 10 jours environ, par un simple séjour au bain-marie bouillant pendant 10 minutes.

Méthode de détection des Collagénases.

a) Il existe une méthode simple et rapide de détection qui consiste à introduire un fragment de Collagène dans le tube de bouillon que l'on va ensemencer. Les tubes mis à l'étuve à 37° sont surveillés et si la lyse se produit, l'on verra disparaître le Collagène. Mais le trouble et le dépôt qui apparaissent rapidement gênent considérablement l'observation, aussi avons-nous préféré la méthode des filtrats.

b) *Méthode des filtrats.* — Les cultures de 24 heures sur bouillon V.F.P. et à 37°, sont filtrées sur un filtre Seitz, de beaucoup préférable aux bougies Chamberland qui retiennent une bonne partie de l'enzyme et inactivent ainsi les filtrats (constatation faite en 1931-1932 par WEINBERG et RANDIN à propos du ferment fibrolytique du *Cl. histolyticum* en tous points semblable aux Collagénases).

Les filtrats sont recueillis dans des flacons stériles sont et conservés à la glacière. Chaque jour on en prélève 2 cc. que l'on met en présence de petits fragments de Collagène. L'activité collagénasique peut être ainsi suivie en fonction du temps.

Résultats.

Nous les résumons dans le tableau suivant :

Souches	*Nombre de souches*	*Présence de Collagénase*
W. perfringens type A	4	Néant
Cl. histolyticum	3	*Présence*
Cl. sporogènes	2	Néant
Cl. œdematiens	2	Néant
Cl. aerofœtidum	1	Néant
Cl. septicum	2	Néant
Cl. bifermentans	1	Néant

Les filtrats ne provoquant pas la lyse du Collagène après un contact de 24 heures à l'étuve à 37°, étaient surveillés pendant un certain nombre de jours (au moins 5 jours). Certaines souches de *Cl. histolyticum* (une dans notre expérimentation) peu riches en Collagénase, peuvent ne provoquer la lyse totale qu'au bout de 36 à 48 heures. Les autres germes étudiés sont restés absolument inactifs.

Les Collagènes servant de réactifs provenaient de sources variées : tendons de queue de rat, tendons de pattes de bovidés, cordon ombilical et membranes fœtales. Aucune différence appréciable n'a été remarquée au cours de ces divers essais. La peau de bovidé employée au début de notre travail s'était montrée plus réfractaire à la désintégration, parce que mal purifiée sans doute.

Etude des propriétés de la Collagénase de Cl. histolyticum.

1° *Stabilité* :

Les filtrats de cultures de 24 heures étaient placés les uns à la glacière à + 4°, les autres à l'étuve à 37°. Chaque jour, 2 cc. de filtrats, des deux sortes d'échantillons, étaient mis en contact avec un fragment de Collagène purifié et placés à l'étuve à 37°. Au bout de 24 heures, on observait les modifications subies par le Collagène, après agitation des tubes pour mieux juger de la dissociation.

Stabilité à + 4° (2 souches étudiées).

Nous résumons les résultats dans le tableau suivant :

Age des filtrats	*Activité*
24 heures	+++ (lyse en 20 h.)
48 heures	+++
3e jour	+ (lyse en 36 à 48 h.)
5e jour	+ (lyse en plus de 48 h.)
8e jour	+ ou —
11e jour	+ (?) ou —
15e jour	—

En conclusion, l'activité de la Collagénase ne persiste pas plus de 11 jours à la température de + 4°. Pour l'une

de nos souches, l'enzyme avait perdu toute action sur le Collagène dès le huitième jour.

Stabilité à 37° (mêmes souches).

Age des filtrats	*Activité*
24 heures	+++
48 heures	+++
3e jour	++
5e jour	+
10e jour	+ ou —
12e jour	—

La diminution d'activité subit donc la même courbe descendante que dans l'expérience précédente. Elle nous a semblé cependant plus rapide (perte totale d'activité bien avant le quinzième jour).

2° *Action de la chaleur.*

L'enzyme perd son activité très rapidement sous l'action brutale de la chaleur, il suffit d'un séjour d'une demi-heure dans un bain-marie à 50° pour faire disparaître toute activité collagénasique.

3° *Influence du* pH.

Toutes nos déterminations ont été faites au pH 7,6 ; il était intéressant de contrôler après E. BIDWELL en particulier, les modifications de l'activité enzymatique aux différents pH. Voici les résultats obtenus (2 cc. de filtrat amenés au pH voulu + 1 fragment de réactif) :

pH 3	Action nulle sur le Collagène
pH 4	Action nulle sur le Collagène
pH 8	Légère attaque
pH 10 et 12	Légère désintégration

L'on voit que la collagénolyse ne se produit que dans la zone de pH voisine de 7,6 (pH optimum). La désintégration observée aux pH très alcalins est imputable à l'action de l'alcali et non à celle du filtrat.

4° *Substances inhibitrices de la Collagénase.*

Les filtrats de cultures de 24 heures de *Cl. histolyticum*, répartis en tubes stériles, ont été additionnés d'un certain nombre de substances et dans chaque tube on plaçait un fragment de Collagène, le tout était porté à l'étuve à 37°.

Résultats :

Substances chimiques	*Activité collagénasique en 24 heures*
$Cu\,SO_4$ à 0,002 %	++
$Hg\,Cl_2$ à 0,002 %	0
$Ag\,NO_3$ à 0,002 %	0
$Zn\,SO_4$ à 0,015 %.....	+++
Témoin	+++

L'on voit d'après cette expérience que $Hg\,Cl_2$ et $Ag\,NO_3$ ont inhibé complètement l'activité de la Collagénase. Les deux autres substances sont, par contre, restées sans effet par rapport au témoin.

5° *Activateurs de la Collagénase.*

Une expérience semblable a été réalisée en présence de glutathion et d'hydrosulfite de soude ($S_2\,O_4\,Na_2$) aux taux de 0,002 %. Les fragments de Collagène ont été dissous plus rapidement que dans le tube témoin contenant du filtrat pur. Ces deux substances sont donc activatrices et ces résultats confirment ceux de Weil, Kocholaty et Smith (1939) [86] qui montraient le rôle activateur des composés à groupes — SH.

Nous avons poussé plus loin cette expérience en étudiant l'activité d'une Collagénase atténuée par le vieillissement (Collagénase de 10 jours) en présence de glutathion. Alors que la Collagénase vieillie ne dissolvait plus le Collagène purifié, le filtrat additionné de glutathion (0,002 %) le désintégrait aussi rapidement qu'une Collagénase fraîche.

Il semble donc que le glutathion est non seulement un activateur, mais aussi un régénérateur de l'enzyme puisque le filtrat atténué a pu en sa présence retrouver toute son activité.

L'expérience reprise avec un filtrat chauffé à 50° pendant 4 heures et additionné de glutathion n'a pas abouti à une reprise du pouvoir collagénolytique ; l'enzyme est complètement détruit par la chaleur, il n'est qu'inactivé par le vieillissement.

Il résulte de toutes ces expériences que les Collagénases ont leur optimum d'activité à un *p*H compris entre 6,5 et 7 et à 37°. Elles sont détruites entre 45 et 50° et s'atténuent à + 4° entre le huitième et le quinzième jour, et à 37° entre le cinquième et le dixième jour. Les sels d'argent et de mercure les rendent inactives ; tandis que les sulfates de cuivre ou de zinc sont sans effets nocifs sur elle. Les composés à groupes — SH se comportent comme des activateurs, mais le glutathion redonne en outre leur activité aux filtrats atténués par le vieillissement.

Relations entre la toxicité et le pouvoir collagénolytique.

Nous avions coutume d'étudier parallèlement le pouvoir de lyse du Collagène de nos filtrats et leur toxicité sur la souris blanche. Il nous a semblé que toxicité et collagénolyse étaient dissociables, la souche la plus toxique tuant la souris en quelques heures, avait une activité beaucoup moins rapide sur le Collagène qu'une autre souche à peu près dénuée de virulence.

Ces observations montrent donc que sécrétion de Collagénase et virulence pourraient s'opposer et nous avons émis l'hypothèse que la Collagénase sécrétée par le germe pourrait, dans une certaine mesure, détruire l'activité de la toxine.

On sait, en effet, que les toxines sont des protéines, il n'est donc pas impossible qu'une protéinase aussi énergique que la Collagénase de *Cl. histolyticum* puisse agir sur le facteur léthal de ce même germe. De tels faits ont déjà été observés quant à l'action de la papaïne sur les toxines diphtériques et tétaniques par Velluz ; et sur l'hémolysine staphylococcique (thèse de Peluchon [67]). Nous avons alors mis en œuvre l'expérience suivante.

Une hémolysine de *Welchia perfringens*, préparée au laboratoire, se montrait très active diluée au 1/16 ; elle fut mélangée d'une part avec un filtrat de *Cl. histolyticum*, d'autre part, avec le même filtrat additionné de glutathion.

Résultats après observation de 20 heures à 37° :

Hémolysine pure (témoin) : H. au 1/16 ;
Hémolysine + Collagénase : H. au 1/8 ;
Hp. au 1/16 ;
Hémolysine + Collagénase : H. au 1/8 ;
+ glutathion : Hp. au 1/16.

(H. : hémolyse totale de globules rouges humains.)
(Hp. : hémolyse partielle.)

Il semble donc qu'il y ait eu baisse du pouvoir hémolytique de la toxine de *W. perfringens* sous l'influence du filtrat de *Cl. histolyticum*.

(Il va sans dire que dans les taux d'hémolyse exprimés il a été tenu compte de la dilution de la toxine *perfringens* par l'addition de la Collagénase et du glutathion.)

Une autre série d'expériences fut entreprise sur l'animal : un filtrat de *Cl. histolyticum*, naturellement toxique pour la souris, fut additionné de glutathion (activateur de la Collagénase), d'une part, et de Ag NO_3 N/100 d'autre part (inhibiteur).

La toxine et ces deux substances restaient en contact 24 heures à l'étuve à 37°. Puis l'on injectait 0 cc. 5 des mélanges à des souris par voie péritonéale. Le premier lot de souris recevait la toxine + glutathion ; le deuxième lot : la toxine seule (+ sérum physiologique pour réaliser la même dilution) et le troisième lot recevait la toxine + Ag NO_3.

Les souris ayant reçu la toxine pure et la toxine + Ag NO_3 sont toutes mortes (4 sur 4), les souris inoculées avec la toxine + glutathion ont parfaitement résisté à l'inoculation.

Dans une seconde expérience, nous avons additionné la toxine d'hydrosulfite de soude (activateur) et d'hydrosulfite de soude + un fragment de Collagène. Après un

séjour de 20 heures à 37°, les mélanges étaient injectés (0 cc. 5 par voie péritonéale). Résultats :

— 4 souris témoins (toxine seule) = 4 décès en 24 heures.

— 4 souris + toxine + $S_2\ O_4\ Na_2$ = 1 décès en 24 heures.

— 4 souris + toxine + $S_2\ O_4\ Na_2$ + Collagène = 3 décès en 24 heures ; 1 décès au bout de 48 heures.

Il résulte de ces deux expériences qu'avec une toxine active, 6 souris inoculées sont mortes en moins de 24 heures ; le filtrat additionné d'un inhibiteur de la Collagénase offre la même toxicité ; additionné de glutathion ou d'hydrosulfite de soude, il perd, au contraire, une grande partie de son pouvoir toxique puisque sur 6 animaux inoculés un seul est mort. Remarquons maintenant que le fait d'ajouter un fragment de Collagène en même temps que l'activateur de la Collagénase semble empêcher l'atténuation de la toxicité du filtrat par l'activateur ; peut-être le Collagène fixe-t-il sur lui l'enzyme qui n'agit plus alors sur les constituants toxiques du filtrat? On peut bien entendu opposer à cette hypothèse la notion de spécificité enzymatique qui ne permet aux Collagénases qu'une action élective sur le Collagène et non sur la toxine ou l'ensemble des produits toxiques contenus dans le filtrat. Il est cependant possible d'envisager aux côtés de la Collagénase d'autres enzymes, d'autres protéolysines que l'on pourrait appeler des « *toxinases* » si ce néologisme pouvait nous être permis.

On ne peut, en effet, expliquer autrement la perte de toxicité en présence de certains activateurs des protéolysines. Là encore, nous pourrions rapprocher ces expériences de celles de VELLUZ sur l'inactivation des toxines par la papaïne.

La toxicité variable des souches pourraient ainsi se concevoir comme un jeu de balancement entre la sécrétion des toxines et celle d'enzymes protéolytiques chez certains germes. Un excès d'enzymes entraînant une diminution de la toxicité et *vice versa*.

Ces faits mériteraient confirmation, des expériences de contrôle sont en cours pour vérifier ces hypothèses énoncées.

Comparaison entre Collagénases et autres protéinases.

Neumann et Tytell (1950) [61] ont déjà comparé l'activité collagénasique et celles de la papaïne, de la trypsine, de la chymotrypsine et de la pepsine. Nos expériences sont arrivées aux mêmes résultats. Elles étaient conduites de la manière suivante :

Des fragments de Collagène « purifié » étaient mis en présence de solutions de pepsine, de trypsine et de papaïne dissoutes au taux de 1 % dans de l'eau physiologique (NaCl à 0,85 %). Le *p*H était ajusté à 3 pour la pepsine, 7,5 pour la trypsine et 6 pour la papaïne. L'action était suivie à l'étuve à 37°.

Alors que la pepsine et la trypsine se montraient sans action sur le Collagène (elles attaquent la poudre de peau [Neumann et Tytell]), la papaïne le dissolvait très rapidement.

Ces faits sont résumés dans le tableau suivant :

Pepsine à *p*H 3 = action nulle.
Trypsine à *p*H 7,5 = action nulle.
Papaïne à *p*H 6 = très active.

Parmi les enzymes protéolytiques, la papaïne semble donc être seule à posséder aussi un pouvoir collagénolytique.

Dissociation des activités gélatinolytique et collagénolytiques.

Deux centimètres cubes de filtrats vieillis à l'étuve à 37° pendant 3 semaines et à la glacière à + 4° pendant le même temps, furent mis en présence de 3 cc. de gélatine à 15 %. En quelques heures, ces filtrats qui avaient perdu toute activité collagénolytique, ont liquéfié la gélatine.

Les tubes contenant les filtrats + gélatine étaient placés à l'étuve à 37° et à *p*H 7,5. Au bout de 12 heures, on transportait le matériel au frigidaire où il restait une demi-heure. On pouvait alors vérifier la complète liquéfaction de la gélatine dans les tubes-réaction, alors que les tubes témoins étaient resolidifiés.

Ainsi donc, gélatinase et Collagénase se distinguent aisément et ne peuvent être assimilées.

CONCLUSIONS

Ce travail n'avait aucunement la prétention d'épuiser le problème dit des « Collagénases Microbiennes ». Nous avons cherché seulement à mettre l'accent sur la nécessité absolue de s'entendre sur la définition de ces Enzymes.

1° Si l'on définit une diastase par son action sur un substrat spécifique, seul mérite l'étiquette de « Collagénase » l'Enzyme capable de dissoudre du Collagène vrai.

2° Cette définition implique l'énoncé des caractères du Collagène :

Il s'agit, comme nous l'avons montré, d'un Scléroprotéide, haut polymère d'amino-acides contenant environ 95 % de substances protéiques ; insoluble dans tous les réactifs, transformable en Gélatine à 60° en présence d'eau, ayant une structure histologique et électronique bien définie.

3° Le Collagène A de NAGEOTTE et L. GUYON utilisé comme réactif des Collagénases par certains auteurs, sous le nom de « Papier de Collagène », n'est pas du Collagène au sens précis du mot.

4° En respectant la définition donnée : seul parmi les Clostridiacées de la Gangrène, *Clostridium Histolyticum* peut être considéré comme sécréteur du Collagénase.

5° La Collagénase, filtrable sur filtre Seitz, est détruite par la chaleur à 50°.

Elle perd son activité vers le onzième jour à + 4° et vers le sixième à 37°.

Elle est activée et réactivée par les thiocomposés ; Glutathion et Hydrosulfite de soude,

Elle est inhibée par les sels d'Argent et de Mercure.

6° A côté de la Collagénase, le filtrat de *Clostridium Histolyticum* semble contenir d'autres protéolysines. Nous avons pensé à l'existence possible de *Toxinases* expliquant la perte de virulence de certaines souches.

7° *Clostridium Histolyticum*, comme beaucoup d'autres Anaérobies possède donc la propriété de sécréter de très nombreux Enzymes et plusieurs protéolysines, parmi celles-ci la Collagénase, très singulière et semble-t-il spécifique du *Clostridium Histolyticum*, nous a retenu plus spécialement. Cette diastase n'est pas sans présenter certaines analogies avec l'une des protéinases végétales les plus puissantes . la *Papaïne*.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et, s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes; si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :
Le Doyen,
L. CHELLE

Vu :
Le Président du Jury,
R. DE GRAILLY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER.
Bordeaux, le 9 Juillet 1951.

Le Recteur,
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Altshuler (C. H.) et Angevine (D. H.). — *Am. J. of Path*, (1949), **25**, 1061.
   — *Am. J. of Path.* (1950), **26**, 683.
2. Astbury (W. T.). — *J. Inst. Soc. Leather Trades Chem.* (1940). **24**, 69.
3. — *Colloques Internat. du C. N. de Recherche Scientifique.* vol. II : « Les hauts polymères », Strasbourg (1940).
4. — *Progrès de la Science des Enzymes*, vol. III, p. 63, Intersc, New-York (1943).
5. Aterman (K.). — *The Lancet* (nov. 1950), p. 517.
6. Baggenstoss (A. H.), Schick (R. M.) et Polley (H. F.). — *Am. J. of Path.* (july 1950), **26**, 710.
7. Bear (R. S.). — *J. Am. Chem. Soc.* (1942), **64**, 727.
   — *J. Am. Chem. Soc.* (1944), **66**, 1297.
8. Beek (J.). — *J. Research N. B. S.* (1935), **14**, 217, R.P. 765.
   — *J. Am. Leather Assoc.* (1938), **33**, 621.
9. Bensley (S. H.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1950), **52**, 983.
10. Bergmann (M.). — *J. Biol. Chem.* (1935), **110**, 471.
11. Bergmann (M.) et Stein (W. H.). — *J. Biol. Chem.* (1939), **128**, 217.
12. Bidwell (E.), Van Heyningen (W. E.) et Charlwood (P. A.). — *Bioch. J.* (1948), **42**, 140.
13. Bidwell (E.). — *Bioch. J.* (1949), **44**, 28.
14. Bowes (J. H.) et Kenten (R. H.). — *Bioch. J.* (1948), **43**, 358.
    — *Bioch. J.* (1948), **43**, 365.
    — *Bioch. J.* (1949), **45**, 281.
15. — *Bioch. J.* (1950), **46**, 1.
    — *Bioch. J.* (1950), **46**, 524.

16. Bowes (J. H.). — *Bioch. J.* (1950), **46** 350.,
17. Brisou (J.). — *Ann. Inst. Pasteur* (1950), **79**.
18. Brisou (J.) et Babin (R.). — *C. R. Soc. Biol.* (1950), **144**, 1166,
18 *bis*. Brisou (J.) et Milhade (J.). — *Bull. Soc. Chimie Biol.*(1951). **33**, 64.
19. Burgess (J. F.). — *The Lancet* (7 aug. 1948), 215.
20. Catchpole (H. R.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1950), **52**/7, 989.
21. Cohn (E. J.) et Edsall (J. D.). — *Reinhold Publ. Corpor.* (1943), 330 Wets 42 Street N.W.
22. Dakin (H. D.). — *J. Biol. Chim.* (1920), **44**, 499.
23. Day (T. D.). — *Nature* (London, 1947), **159**/4029, 100.
— *The Lancet* (1947), **2**/26, 945.
24. Delaunay (M.), Guillaumie (M.) et Delaunay (A.). — *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **76**, 16.
— *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **76**, 220.
— *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **77**, 603.
25. Dernby et Blanc. — *J. of Biol.* (1921), **6**, 419.
26. Ducommun (P.) et Mach (R. S.) (Genève). — *Sem. des Hôpitaux* (2 sept. 1950), **65**, 3170.
27. Elster (S. K.). — *Am. J. of Path.* (july 1950), **26**, 711.
28. Evans (D. G.). — *The Lancet* (1945), ii, 477.
— *J. of Gen. Microbiol.* (1947), **1**, 378.
29. Fiessinger (N.). — *Bull. Acad. Paris* (1945), **129**, 478.
30. Gale (J. G.). — *Am. J. of Path.* (july 1950), **26**, 707.
31. Gersh (I.) et Catchpole (H. R.). — *Am. J. Anat.* (1949), **85**, 457.
32. Graham (C. E.), Waitkoff (H. K.) et Hier (S. W.). — *J. of Biol. Chem.* (1949), **177**/2, 529.
33. Grassmann (W.) et Schleich (H.). — *Bioch. Z.* (1935), **277**, 320.
34. Grassmann (W.), Schneider (W. F.) et Richter (G.). — *Collegium* (1940), **839**, 97.
35. Gross (J.). — *Ann. of the Rheumatic Diseases* (1948), **7**, 33.
— *The J. of Exp. Med.* (1948), **88**/**5**, 555.
— *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1950), **52**/7, 964.
36. Guillaumie (M.). — *Ann. Inst. Pasteur* (1941), **66**, 329.

37. Guillaumie (M.), Kreguer (A:) et Fabre (M.). — *Ann. Inst. Pasteur* (1946), **72**, 384.
38. Guillaumie (M.), Mrchewitch (S.), Delaunay (M.) et Becoulet (G.). — *Ann. Inst. Pasteur* (1950), **78**, 191.
39. Guyon (L.). — *C. R. Assoc. Anat.* (1931), 26e réunion, Varsovie.
39. — *C. R. Assoc. Anat.* (1937), 32e réunion, Marseille.
40. Hass (G.) et Mc Donald (F.). — *Am. J. of Path.* (1940), **16**, 525.
41. Heringa (G. C.). — *Verhandelingen kon. Vlaamse Acad. Woor• Jeneeskunde van Belgie* (1948), **10**/1, 7.
42. Highberger (J. H.). — *J. Am. Leather Chem. Assoc.* (1936), **31**, 93 et 345.
43. Hudack (S. S.), Blunt Jr. (J. W.), Higbee (P.) et Kearin (G. M.). — *Proceed. Soc. Exptl. Biol. and Med.* (1949), **72**, 526.
44. Huggins (M. L.). — *Chem. Rev.* (1943), **32**, 195.
45. Jennisson (M. W.). — *J. of Bact.* (1945), **50**/3, 369.
46. — *J. of Bact.* (1947), **54**, 55.
47. Kanagy (J. R.). — *Circular C.* 458 *of the Nat. Bureau of Standards U. S. Depart. of Commerce.* U. S. Government Printing Office (1947).
48. Klemperer (P.). — *Am. J. of Path.* (july 1950), **26**, 505.
49. Laguesse. — *Arch. Biol.* (1921), **31**, 173.
50. Lison (L.). — *Arch. Biol.* (1935), **46**, 599.
51. Loeb (J.). — *Proteins and the theory of Colloïdal Behavior* (Mc Craw Hill Book Co, N. Y., 1924).
52. Mc Clean (D.). — *The Lancet* (1941), **1**, 797.
53. Mc Clean (D.) et Hale (C. W.). — *Biochem. J.* (1941), **35**, 159.
54. Macfarlane (M. G.) et Mc Lennan. — *The Lancet* (sept. 1945,. 328.
55. Madinaveitia. — *Nature* (London, 1940), **146**, 197.
56. Maschmann. — *Biochem. Z.* (1937), **295**, 351.
— *Biochem. Z.* (1938), **297**, 284.
— *Biochem. Z.* (1939), **300**, 89.
57. Meyer (K. H.). — *Natural and Synthetic High Polymers*, vol. IV. Intersc. Publish. N. Y. (1942).
— *Ann. Rheumatic diseases* (1945), **7**/1, 33.
58. Morrione (Th. G.), **85**, 217. *J. of Exp. Med.* (1947).

59. Nageotte (J.) et Guyon (L.). — *C. R. Soc. Biol.* (1933), **123** 1938.
— *C. R. Soc. Biol.* (1933), **123**, 1401.
— *C. R. Soc. Anat.* (25-28 mars 1934), 1.
60. Neuman (R. E.). — *Arch. Biochem.* (1949), **24**, 289.
61. Neuman (R. E.) et Tytell (A. A.). — *Proceed. Soc. Exeptl. Biol. and Med.* (1950), **73**, 409.
62. Oakley (C. L.), Warrack (G. H.) et Van Heyningen (W. E.). — *J. Path. and Bact.* (1946), **58**, 229.
63. Oakley (C. L.), Warrack (G. H.) et Clarke (P. H.). — *J. Gen. Microbiol.* (1947), **1**, 91.
64. Oakley (C. L.). — *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **77**/4, 380.
65. Oakley (C. L.) et Warrack (G. H.). — *J. Gen. Microbiol.* (1950), **4**/3, 365.
66. Partridge (S. M.). — *Biochem. J.* (1948), **43**, 387.
67. Peluchon. — Thèse Médecine Bordeaux (1949).
68. Pirani (C. L.) et Stepto (R. C.). — *Ann. J. of Path.* (1950), **26**, 749.
69. Plotz (C. M.), Howes (E. L.), Meyer (K.), Blunt Jr. (J. W.), Latts (R.) et Ragan (C.). — *Am. J. of Path.* (july 1950), **26**, 709.
70. Poff (G. H.) et Bloom (F.). — *The Anatomical Record* (Philadelphie, 1949), **103**/3, 493.
71. Porter (K. R.) et Vanamee (P.). — *Proceed. Soc. Exptl. Biol, and Med.* (1949), **71**, 513.
72. Pozerski (E.) et Guélin (A.). — *C. R. Soc. Biol.* (1938), **128**. 842.
73. Pratt (A. W.) et Wyckoff (R. W. G.). — *Biochimica Biophysica, Acta Amsterdam* (1950), **5**/2, 165.
74. Robb-Smith (A. H. T.). — *The Lancet* (1945), **249**, 362.
75. Schmitt (F. O.). — In *Advances in Protein chemistry*, vol. I, 48. Academic Press. N. Y. (1944).
76. Spain (D. M.), Molomut (N.) et Haber (A.). — *Am. J. of. Path.* (july 1950), **26**, 710.
77. Taubenhaus (M.) et Ambromin (G. D.). — *J. of Lab. and Clin Med.* (july 1950), **36**, 7.

78. Thomas (A. W.) et Kelly (M. W.). — *Ind. Eng. Chem.* (1922): **14**, 621.
— *Ind. Eng. Chem.* (1928), **20**, 632.
79. Thomas (J. A.). — *C. R. Soc. Biol.* (1941), **135**, 934.
80. Todd (E. W.). — *J. of Exp. Med.* (1947), **85**, 591.
81. Tytell (A. A.) et Hewson (K.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* (1950), **174**/3, 555.
82. Urtubey (L.). — *Bull. d'Histologie appliquée et de technique microscopique* (1948), **25**/8, 151.
83. Weinberg (M.) et Randin (A.). — *C. R. Soc. Biol.* (1931), **107**, 27.
— *C. R. Soc. Biol.* (1932), **110**, 352.
84. Weinberg (M.), Nativelle (R.) et Prévot (A.). — *Les microbes anaérobies*, Masson, Paris (1937) ; *Bacillus histolyticus*, p. 373.
85. Weil (L.) et Kocholaty (W.). — *Biochem. J.* (1937), **31**, 1255.
86. Weil (L.), Kocholaty (W.) et Despain Smith (L.). — *Biochem. J.* (1938), **32**, 1685-1691-1696.
— *Biochem. J.* (1939), **33**/1, 893.
87. Wilson (J. A.) et Gallum (A. F.). — *Ind. eng. Chem.* (1923), **15**, 71.
88. Wislocki (G. B.), Bunting (H.) et Dempsey (E. W.). — *Am. J. of Anat.* (1947), **81**, 1.
89. Wolbach (S. B.). — *Am. J. of Path.* (1933), **9**, 689.

BORDEAUX
IMPRIMERIE R. SAMIE
21-23, Rue Teulère

—

1951

Dépôt légal n° 15.344 — 3e Trimestre 1951